
基礎系教育講演

納得できる美しい写真を撮るためには？

羽地 達次

キーワード：オートラジオグラフィー，ゲル，組織細胞化学，免疫組織化学，細胞，組織

How to Get Beautiful Photographs to be Published

Tatsuji HANEJI

Abstract : In the recent years, scientific articles are required to include the photograms of cells or tissues in addition to the figures of gels or PCR products. However, inappropriate or poor photographs are often seen even in the top journals. In this review article, I demonstrate how to get the beautiful pictures or photographs presented in the journals. I present the pictures of autoradiography of phosphorylated proteins. The results of Western analysis show that PP1 δ localized in the nucleolar regions in human and mouse cells. Nucleolar localization is easily recognized in the pictures of dual staining with anti-PP1 δ antibody and anti-C23 antibody and immunoprecipitation with Western analysis. Identification of cells that synthesize and secrete special proteins is presented by the cultured cells from testis. Histochemical identification of Avidin-interacting proteins localized in mitochondria is presented in the cells stained with Mito Tracker and FITC-Avidin. My recommendation about how to get beautiful pictures presented in the top journals is described in the present review article.

I. はじめに

ひと昔前までは解剖学教室（組織学・生物学を含む）に在籍する者にとっては美しい細胞や組織の写真を論文や学会で発表することが使命であった。美しくない写真はそれこそ価値がないといわれ、電子顕微鏡の写真等は極端に言えば学問の内容や本質よりもその美しさが評価されていた時代があった。当時の研究には写真撮影のコツが必要であり、職人技を持った学者が多数いた。また論文の作製にもこだわりを持った研究者が多かった。その中には歴史に残る写真を提供した学者が多数いることも事実である。本稿では、正確なデータを提供し、顕微鏡像を含めた「美しい写真」を得るにはどうしたらよいか、人を納得させ、うならせる写真はどの様にして撮るか、説得力のある写真はどの様にしたら手に入れることができるのか等について、私の過去の経験を踏まえ

ながら、その根拠となった写真を供覧し論じる。

II. タンパク質リン酸化と脱リン酸化の検出

細胞増殖，細胞分化，細胞の癌化やアポトーシスの制御にタンパク質のリン酸化・脱リン酸化が重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。30年程前には、タンパク質のリン酸化を検出するには、³²Pでラベルされたリン酸で細胞をラベルし、電気泳動後、乾燥したゲル上の放射能をフィルムに写し取るオートラジオグラフィー法が広く用いられていた。乾燥したゲルにガイガーカウンターを当て、警告音が出るか出ないかで一喜一憂したものだった。現在では考えられない光景である。図1 Aに20 kDaのタンパク質がリン酸化されている図を示す。この図が都合の良い部分だけを切り取りしたものでないことは、ゲル全体のオートラジオグラフィー像（図1 B，左）を提供す

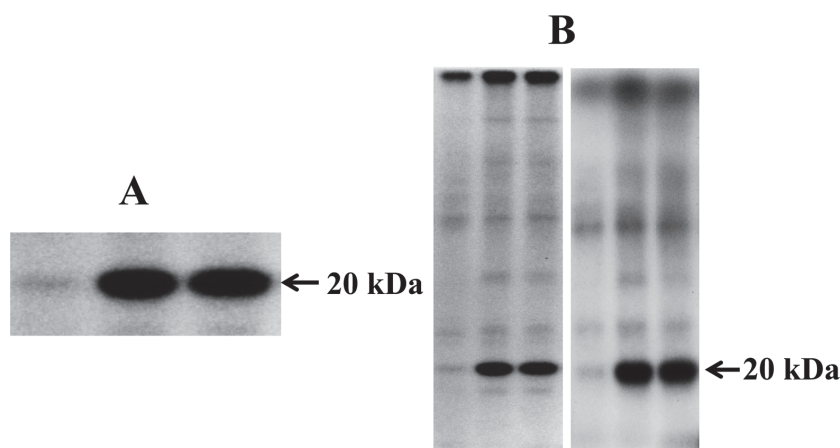


図1 オートラジオグラフィーによるリン酸化タンパク質の検出
Spisula の卵を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP でラベルした後、5-HT で処理し卵割を誘導した。10分と30分後に卵から膜画分を調製し12%のアクリルアミドを用いて電気泳動後オートラジオグラフィーを行い、リン酸化されたタンパク質を検出した。
 (A) 反応陽性のバンドを切り出し短冊を作成した。
 (B) 左の写真は (A) のゲルの全長を示している。また、右の写真は10%ゲルを用いて同様の実験をした結果を示している。

ることで証明できる^{4,5)}。ところが現在では図1Aのように切り取った写真のみを提示する方が圧倒的に多い。このような「良い結果」が得られたら、同じ試料を用いて同様な実験を繰り返し、最も納得のいく結果を発表用として用いることを勧める。繰り返し実験をした結果も図1Bに示す。結果としては同じであるが、濃度の低いゲル(10%)を用いたために、シャープさが違う。どちらを使用しても納得できる結果であるが、その「美しさ」から発表用には前者を用いた。本稿では乾燥ゲルの写真の供覧は割愛したが、当時はゲルの写真を図の一部として加えるよう指摘された^{4,5)}。

タンパク質脱リン酸化酵素は、セリン・スレオニンに結合したリン酸基を特異的に切り離す酵素、チロシンに結合したリン酸を脱リン酸化する酵素、およびその両者を脱リン酸化する酵素の3種類に大別される。セリン・スレオニン特異的タンパク質脱リン酸化酵素は、古くはPP1, PP2A, PP2B, PP2Cに分類された^{1,3)}。さらに、PP1はPP1 α , PP1 δ , PP1 γ 1, PP1 γ 2の4種類に分類された^{6,7)}。現在では多くの脱リン酸化酵素が発見され、その分類は多岐にわたっている。我々は、培養したMC3T3-E1骨芽細胞で細胞分画を行い、細胞質画分、核画分および核小体画分から電気泳動用試料を調製し、ウェスタンブロット法にて、抗-PP1 δ 抗体と反応するタンパク質を同定した⁸⁾。図2AはMC3T3E1細胞の各画分における抗-PP1 δ 抗体と反応するタンパク質を示す。この図からPP1 δ は核小体に存在する37 kDaのタンパク質であることが明らかである。同様な所見はヒトを含めた他の細胞でも認められる⁹⁻¹¹⁾。オートラジオグラフィーの項と同様に、私は図2Aのような「ポジティブな(良

い) 結果」が得られたら、あと2・3回同じ試料を電気泳動し同様な実験を繰り返し、最も納得のいく結果を発表用として用いている。何回か実験した結果を図2Bにまとめた。いずれの結果も37 kDaのタンパク質は核小体に局在することを示しているが、中段の写真が最も説得力があり、学会等ではこの図を好んで用いてきた。

Ⅲ. 二重染色を用いた免疫組織化学

細胞はそれぞれの機能に応じて特異的なタンパク質を産生・分泌する。この様子を調べるには細胞が産生するタンパク質を指標にして細胞を見分ける必要がある。図3に精巣を構成する体細胞を培養し、Sertoli cellとperitubular myoid cellのうちどの細胞がフィブロネクチンを産生しているかを調べた結果を示している。ヘキストによる核染色と抗-フィブロネクチン抗体を用いて免疫染色をして、それぞれの細胞とフィブロネクチン産生細胞を同定した。この写真を撮った当時(30年前)にはmergeしてコンピューター上で記録するという技術は普及していなかった。2重染色した細胞を白黒フィルム上で記録し、現像後印画紙に焼き付ける作業をした。この作業には「コツ」が必要なことはひと昔前の解剖学者はよく承知している。核染色から2種類の細胞(Sertoli cellがひとつ、peritubular myoid cellが2つ)が区別される。他方免疫染色から、フィブロネクチン陽性の2つの細胞と陰性のひとつの細胞を区別することができる。この結果は、peritubular myoid cellがフィブロネクチンを産生・分泌し、Sertoli cellは産生しないという論争に決着をつけた¹²⁾。この写真を撮るために一日中暗室に閉じこもり印画紙を焼いた記憶がある。自慢できる

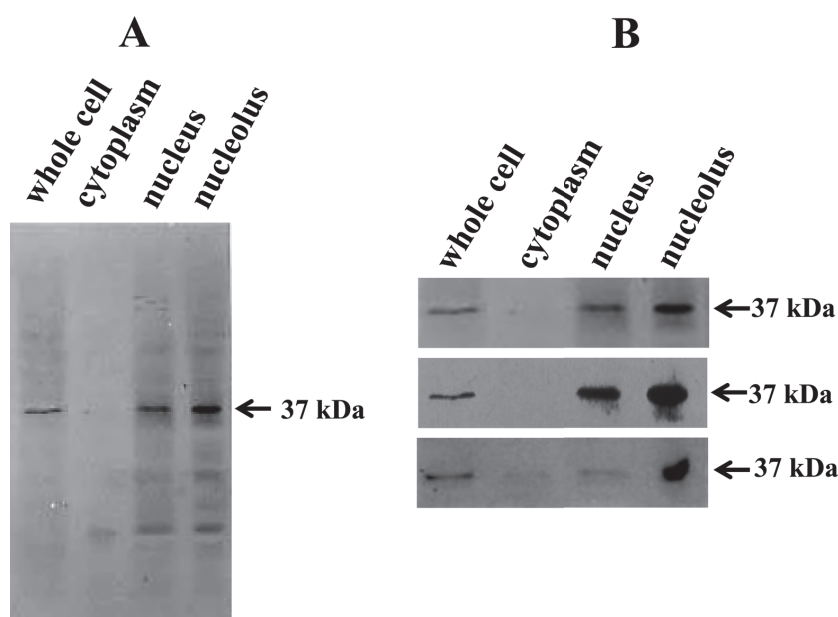


図2 マウス骨芽細胞（MC3T3-E1細胞）におけるPP1δの細胞内局在
 (A) コンフルエント状態のMC3T3-E1細胞で細胞分画を行い、細胞質（cytoplasm）、核（nucleus）、核小体（nucleolus）画分を得た。それぞれの画分から電気泳動用試料を作製して抗-PP1δ抗体を用いてウエスタンブロットを行った。細胞分画前のMC3T3-E1細胞から調製した試料（whole cell）を対照として用いた。PP1δは核小体に存在する37 kDaのタンパク質を強力に認識した。
 (B) (A)で行った実験を何回か繰り返して、反応陽性のバンドのみを短冊様に切り取りして並べた。いずれの図も37 kDaの陽性バンドが核小体に存在していることを示している。

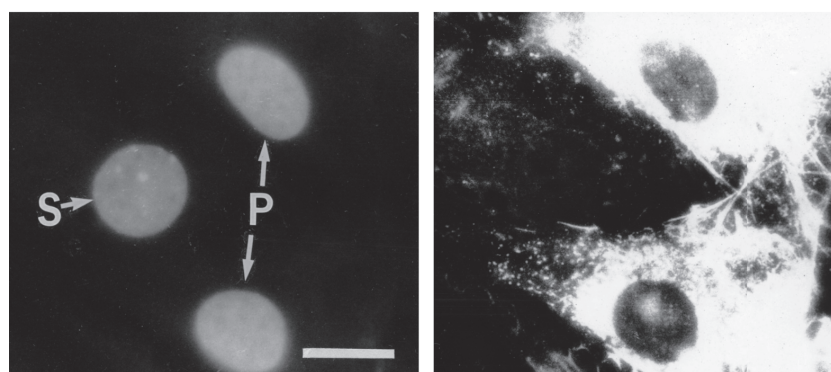


図3 ラット精巣細胞におけるフィブロネクチンの発現
 ラット精巣からの体細胞を培養、固定後、Sertoli細胞とperitubular myoid cellの核をヘキスト33342で、フィブロネクチンの産生を免疫染色法により2重染色した。検鏡後白黒フィルムに結果を記録し、印画紙に焼き付けた。

写真のうちのひとつである。

培養細胞におけるPP1の細胞内局在は特異的で⁷⁻¹¹⁾、特にPP1δは細胞核に5-7個のドット様に発現している（図4）。この部分は核小体に相当する構造物で、上記の細胞分画・ウエスタンブロットの結果と一致する。また、PP1δの存在様式はNucleolar Organizer Regions (AgNORs)の構成タンパク質C23やB23の細胞内局在

と酷似する¹³⁻¹⁷⁾。抗-PP1δポリクローナル抗体と抗-C23モノクローナル抗体、二次抗体としてローダミン標識抗ウサギIgGとFITC標識抗マウスIgGを用い、培養細胞内での両者の局在を蛍光抗体法で調べた⁹⁾。ローダミンの赤色はPP1δを、FITCの緑色はC23を認識する。両者の反応を重ね合わせると、PP1δとC23の細胞内局在は完全に一致し、黄色の反応として検出された（図4）。

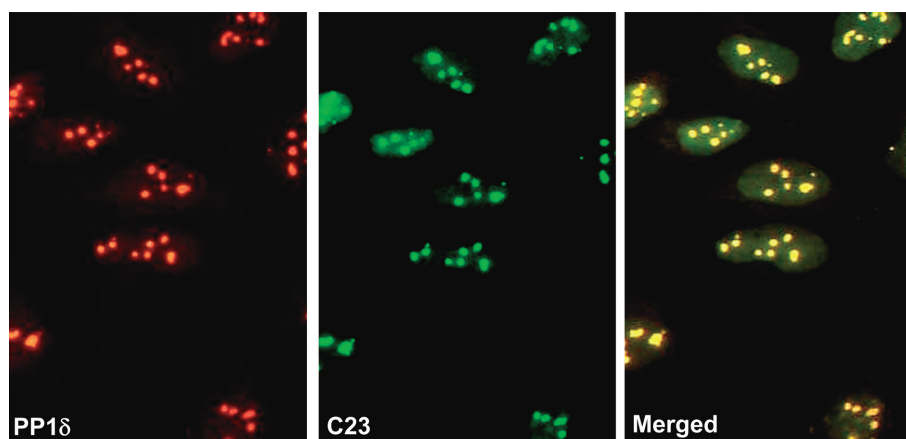


図4 ヒト骨芽細胞 (Saos-2細胞) における PP1δ と C23の局在
培養した Saos-2細胞を固定後、PP1δ と C23の局在を免疫2重染色法により解析した。PP1δ に対する2次抗体としてローダミンを、C23に対する2次抗体として FITC を用いた。PP1δ は赤色に、C23は緑色に染色された。この両者を重ね合わせると、黄色の蛍光として観察された (Merged)。

この結果も出来る限り多くの写真として記録し、自分で納得し、なおかつ他人を説得できる像を発表用として用いた。この時期になると顕微鏡とコンピューターを接続し、顕微鏡像をコンピューターに記録することが可能になっていた。この技術により、時間の節約と写真の選択が容易になった。自動露出にすると発光をより強く認識するので、実験の状態を正確に反映しない。蛍光強度を統一するために手動露出に切り替え、露出時間を統一して何枚もの結果をコンピューターに記録した。次に PP1δ と C23との間に直接的な結合が存在するかどうかを、抗-PP1δ 抗体を用いた免疫沈降法で調べた。抗-PP1δ 抗体を用いて培養細胞の抽出液を免疫沈降すると抗-C23抗体と反応する 110 kDa の反応陽性バンドが検出された⁹⁾。正常ウサギ血清を用いて細胞抽出液を免疫沈降しても抗-C23抗体と反応するバンドは検出されなかった (図5)。この結果は、PP1δ と C23は細胞の核小体内で互いに結合して存在していることを示している。我々は、PP1δ と B23が細胞内で結合して存在することも併せて報告している¹¹⁾。以上の結果から我々は、PP1δ は核小体内に存在する C23や B23と結合し、それぞれを基質として脱リン酸化すると結論した。図5の写真を見ると免疫沈降産物の IgG の量に差があり、Lysate の電気泳動像が切れていることに気がつく。何回も実験を繰り返すことが出来ない性質上から納得できる写真は取れなかったが、この図で本実験の結果は十分に説明できる。

Ⅳ. 組織細胞化学的手法を用いた 細胞内タンパク質の検出

免疫染色を強化する目的で Avidin-Biotin-Complex (ABC) 法が広く用いられてきた¹⁸⁾。ところが Avidin を用いる

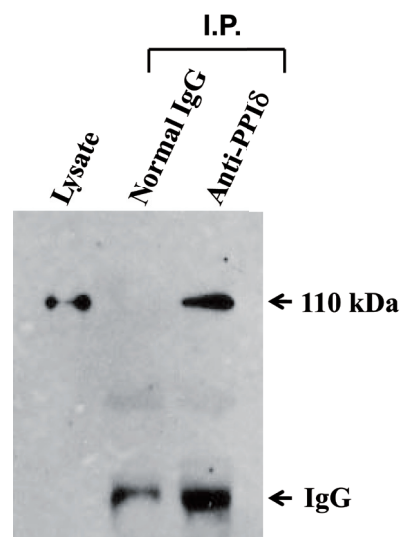


図5 ヒト骨芽細胞 (Saos-2細胞) における PP1δ と C23の結合

Saos-2細胞を培養後試料を作成して抗-PP1δ 抗体と正常 IgG で免疫沈降し、抗-C23抗体でウエスタンブロットを行った。免疫沈降を行っていない試料 (Lysate) を対照として用いた。IgG は非特異的の反応として出現する。

ことで、非特異的なバンドが鮮明に検出されることも事実である^{19, 20)}。図6に3T3-L1細胞における FITC-Avidin の典型的な反応像を示す。FITC-Avidin はミトコンドリアに局在していた。このことは、ミトコンドリアのマーカーである Mito Tracker を用いて二重染色することで確認できる。つまり細胞質、特に核の周囲の細胞内小器官が Mito Tracker により赤く染色された。また、FITC-

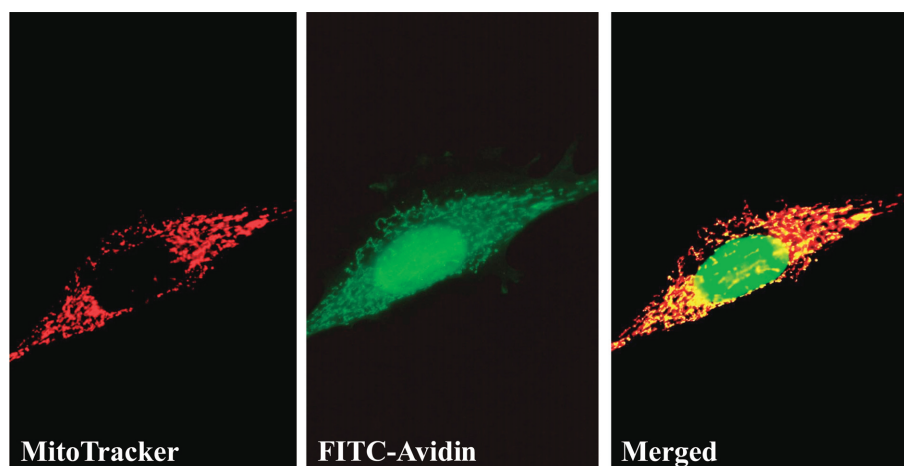


図6 3T3-L1細胞における Avidin 反応タンパク質の局在
コンフルエント状態の3T3-L1細胞を Mito Tracker で45分間処理し、3.7%ホルマリンで固定後、メタノールで透徹した。PBS で軽く洗浄した後、200倍希釈の FITC-Avidin と60分間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて、細胞を Mito Tracker, FITC, Mito Tracker と FITC の2重露出 (Merged) で観察した。

Avidin は核と細胞質に局在し、この両者を重ねると、黄色の染色として検出された (図6)。なお、核の染色は非特異的な反応である。暗室で顕微鏡を覗き、この像が出てきた時に興奮したことが昨日のように思われる。3T3-L1細胞の抽出液を SDS-PAGE で分離し、PVDF膜に転写し HRP-アビジンと反応させると、分子量が120, 74, 72 kDa と推定される3本のバンドが検出される²⁰⁾。以上の結果から、FITC-Avidin と反応するタンパク質はミトコンドリアに存在するビオチンを含むタンパク質であることが判明した。ラットやヒトの細胞を用いた2重染色法でも同様の結果が得られた。FITC-Avidin の代わりに、FITC-IgG と FITC を用いるとこの反応は検出されなかった²⁰⁾。我々はこのタンパク質が分子内にビオチンを含むカルボキシラーゼであることを証明している²⁰⁻²⁵⁾。以上の結果から、ABC法で免疫染色をするときにはこのような非特異的な反応に細心の注意を払うようにすべきである。

V. 考 察

現在の医学・生命科学の学術論文では、タンパク質や遺伝子の動向をゲル上で捉え、それを形として表す方法が多く用いられている。生命科学関係のほとんどの学術論文ではウエスタンブロットや PCR を用いたデータが広く用いられている。また、細胞や組織内における物質の動向を、免疫染色や組織細胞化学的方法を用いて画像として提示しなければ論文が通らないことも多い。つまり、現在の生命科学では細胞や組織を構造と機能の両面から探求していくことが要求されている。ところが、世界の超一流といわれている雑誌に掲載されている論文の中でも、そのデータや写真をよく見ると、不鮮明な

像や適切でない画像が多々見られる。その理由は専門家でない者や未熟な研究者が写真を撮り、コンピューターで画像を処理することに原因があるように思われる。電気泳動の写真をよく見ると、明らかにデータ処理している形跡、都合のよい部分だけを切り取って使用している写真が多々見られる。コンピューターによる画像処理により、現在問題になっている写真の切り貼り (論文の不正) が起こり易くなってきていることも事実である。紙面の節約という理由もあるかもしれないが、それだけの問題ではない。これは研究者個人の問題に帰依する。

本稿で、如何にして「美しい写真」を得るかという問題に沿って我々の研究室で得た細胞の写真を供覧し、論じてきた。筆者の経験から「キレイな写真」を撮るのは写真技術のセンスではなくて、実験の質によるものだと確信している。正確な実験を繰り返せば自ずと「美しい写真」は撮れる。「良い結果」が得られたら、何回か実験を繰り返し、結果を確認し、より「キレイな」データを得ることが必要である。特に最近問題になっているゲルの切り貼りに関しては、ゲル全体の写真を撮っておけば、何の問題も起こらない。また、ゲルのひとつのレーンに気泡が入るなどの不都合が起これば同じ実験を何回か繰り返し、結果に最も忠実な写真を論文や学会発表に使用することを心がける。

VI. おわりに

本稿は平成27年3月26日に行われた第46回四国歯学会例会で基礎系教育講演として発表した内容をもとにしている。過去何年か私が自ら行ってきた研究成果で「キレイ！」と思われる写真を供覧し、どのようにしたらそ

のような写真を撮ることができるか、自己満足も含めて論じた。本稿で紹介した写真はほとんどが私自身で撮ったものであるが、一部は森本景之と佐々木英子と共同で撮ったものも含まれる。何年も前のスライドからコンピューターに移す作業の一部は研究室に配属された研究基礎ゼミ生、阿久津純一、武知由子、筒井瑤子によって行われた。改めて謝意を表する。

引用文献

- 1) Hunter T: Protein kinase and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236 (1995)
- 2) Shi Y: Serine/threonine phosphatases: Mechanism through structure. *Cell* 139, 468-484 (2009)
- 3) Bollen M, Peti W, Ragusa MJ and Beullens M: The extended PP1 toolkit: Designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35, 450-458 (2010)
- 4) Haneji T and Koide SS: Protein phosphorylation during 5-hydroxytryptamine-induced maturation of *Spisula* oocytes. *Exp Cell Res* 177, 227-231 (1988)
- 5) Haneji T and Koide SS: Protein phosphorylation during oocyte maturation in *Asterias* oocytes. *Exp Cell Res* 182, 664-667 (1989)
- 6) Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T and Nagao M: Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81, 1272-1280 (1990)
- 7) Shima H, Haneji T, Hatano Y, Sasaki K, Sugimura T and Nagao M: Protein phosphatase 1γ2 is associated with nuclei of meiotic cells in rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 930-937 (1993)
- 8) Haneji T, Morimoto H, Morimoto Y, Shirakawa S, Kobayashi S, Kaneda C, Shima H and Nagao M: Subcellular localization of protein phosphatase type 1 isotypes in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 39-43 (1998)
- 9) Morimoto H, Okamura H and Haneji T: Interaction of protein phosphatase 1δ with nucleolin in osteoblastic cells. *J Histochem Cytochem* 50, 1187-1193 (2002)
- 10) Haneji T: Association of protein phosphatase 1 delta with nucleolin in osteoblastic cells and cleavage of nucleolin in apoptosis-induced osteoblastic cells. *Acta Histochem Cytochem* 38, 1-8 (2005)
- 11) Haneji T, Teramachi J, Hirashima K, Kimura K and Morimoto H: Interaction of protein phosphatase 1δ with nucleophosmin in human osteoblastic cells. *Acta Histochem Cytochem* 45, 1-7 (2012)
- 12) Haneji T and Koide SS: Identification of cell types in Sertoli cell-enriched cultures by immunocytochemistry and DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Histochem Cell Biol* 89, 57-61 (1988)
- 13) Sirri V, Roussel P, Gendron MC and Hernandez-Verdun D: Amounts of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28 147-156 (1997)
- 14) Derenzini M: The AgNORs. *Micron* 31, 117-120 (2000)
- 15) Ginisty H, Sicard H, Roger B and Bouvet P: Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112, 761-72 (1999)
- 16) Szebeni A and Olson MO: Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8, 905-912 (1999)
- 17) Kito S, Shimizu K, Okamura H, Yoshida K, Fujita M, Morimoto H, Morimoto Y, Ohba T and Haneji T: Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 950-956 (2003)
- 18) Hsu SM and Raine L: Protein A, Avidin, and biotin in immunochemistry. *J Histochem Cytochem* 29, 1349-1353 (1981)
- 19) Bussolati G and Gugliotta P: Non-specific staining of mast cells by Avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem* 31, 1419-1421 (1983)
- 20) Sasaki E, Okamoto Y, Yoshida K, Okamura H, Shimizu K, Nasu F, Morimoto H and Haneji T: Transblot and cytochemical identification of Avidin-interacting proteins in mitochondria of cultured cells. *Histochem Cell Biol* 120, 327-333 (2003)
- 21) Haneji T and Koide SS: Identification of Avidin-interacting proteins in *Spisula* oocytes: Correlation with germinal vesicle breakdown. *J Exp Zool* 246, 216-222 (1988)
- 22) Haneji T and Koide SS: Transblot identification of biotin-containing proteins in rat liver. *Anal Biochem* 177, 57-61 (1989)
- 23) Haneji T, Toyama Y and Nagano T: Detection of endogenous Avidin-interacting proteins in rat liver cells by transblot and electron microscopy. *J Electron Microsc* 42, 232-235 (1993)
- 24) Shirakawa S, Murata T, Takehara T, Kobayashi S and Haneji T: Transblot identification of biotin-containing proteins in rat salivary glands. *Biochem Mol Biol Int* 40, 67-72 (1996)
- 25) Morimoto H, Ozaki A, Okamura H, Yoshida K, Amorim BR, Tanaka H, Kitamura S and Haneji T: Differential expression of protein phosphatase type 1 isotypes and nucleolin during cell-cycle arrest. *Cell Biochem Funct* 25, 369-375 (2007)